Lane Medical Library

STANFORD UNIVERSITY
MAR
8
1938
LIBRARY

Über Nähr-, Wuchs- und Hemmungsstoffe, sowie spezifische Substrate des Bacterium acetylcholini (Keil)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der

Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg

vorgelegt von

Gotthard Decker

Zahnarzt.

Heidelberg
Buchdruckerei Bernhard Müller
1937.

Gedruckt mit Genehmigung
der Med. Fakultät der Universität Heidelberg

Referent: Professor Dr. Eichholtz

Dekan: Professor Dr. Runge.

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

Keil und B. Kritter[1]) hatten zuerst geglaubt, zeigen zu können, daß das Bakt. Acetylcholini (Keil) in Glukose — Salzlösungen, die Ammonacetat oder — Laktat enthalten, gutes Wachstum zeigt. Bei normaler Impfmenge tritt jedoch unter diesen Bedingungen überhaupt kein Wachstum auf. Keil und Weyrauch hatten sich dann später mit der Frage beschäftigt, ob das Leben des Bakt. an die Gegenwart von Wuchsstoffen gebunden ist. Sie stellten in unveröffentlichen Versuchen fest, daß auf Gurkensaft, der kurze Zeit mit wenig Tierkohle aufgekocht wurde, das sonst so starke Wachstum des Bakt. vollkommen unterbleibt. Eine solche Behandlung ist ohne Zweifel als zu grob zu bezeichnen, denn auch Substrate wie Amminosäuren, können auf diese Weise durch Oxydation oder Desaminierung zerstört werden. Aus noch unveröffentlichten Versuchen von Möller und Mitarbeitern geht jedoch hervor, daß auch nach schonendster Behandlung mit verschiedenen Kohlenpräparaten für das Bakt. lebenswichtige Substanzen aus dem Gurkensaft absorbiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich also um in kleinsten Konzentrationen wirksame Wuchsstoffe handelt, wird damit größer. In dieser Arbeit soll nicht die spezielle Frage entschieden werden, welche der drei bisher benannten an Kohle absorbierbaren Wuchsstoffe: Biotin[1a]), Laktoflavin[1b]) und Aneurin[1c]), [1d]) in unserem Falle in Frage kommen, oder ob es sich um einen bisher noch unbekannten Wuchsstoff handelt.

I. Über den Verbrauch von Wuchsstoffen für das Bakt. Acetylcholini durch dieses selbst und durch verschiedene Hefen.

Wir haben vielmehr erst eine Reihe von allgemeinen Fragen angegriffen, vornehmlich interessierte der Verbrauch unseres Bakt. an Wuchsstoffen während der Vergärung*), wobei uns ein Vergleich mit den schon besser bekannten Eigenschaften von Hefen nützlich schien. Zu diesem Zwecke wurden die eine Hälfte von 112 Röhrchen mit je 5 ccm sterilem Gurkensaft mit dem Stamm 10 S des Bakt. Acetylcholini, die andere mit einer Reinzüchtung**) aus käuflicher Bäckerhefe beimpft und bei 25° C bebrütet. Im Verlauf von 7 Tagen wurden nun täglich von jeder Kultur je

*) Die Ursache, weswegen das Wachstum unseres Bakt. auch in zuckerreichen Nährböden nach einiger Zeit aufhört, liegt nicht allein in der Erreichung des bestimmten Säuregrades, sondern auch an der Zerstörung der Wuchsstoffe. Denn durch geeignete Puffer oder Zurückführung des pH auf den Wert vor der Gärung, wobei eine Laktatmenge entsteht, die noch lange nicht in den Bereich der Wachstumshemmung fällt, wird das Wachstum nur noch wenig gesteigert.

**) Durch d. Hygienische Institut der Universität Heidelberg (Prof. Habs.)

8 Röhrchen entnommen, durch Kieselgur filtriert, und jeweils 2 mit folgenden Zusätzen versehen:

I. ohne Zusatz
II. + 0,1 g Glukose
III. + Natronlauge m/1 (bis schwach sauer geg. Lackmus).
IV. = Zusätze von II und III.

Nach dem Sterilisieren wurde hälftig mit Bakt. und Bäckerhefe beimpft und zwar so, daß alle Kombinationen vorhanden waren. Während der Bebrütung bei 25°C erfolgte nun die tägliche Kontrolle des Wachstums. Dies stellt also unter den Bedingungen mit Zusatz IV, die denjenigen vor der Vergärung bis auf die Wuchsstoffe prinzipiell gleich sind, ein Maß für die Konzentration der noch in der Nährlösung vorhandenen Wuchsstoffe dar. (Die unter I - III angestellten Versuche sind aus anderen Gründen angesetzt, die in einem späteren Abschnitt besprochen werden.)

Die Ergebnisse sind abgekürzt in der Tabelle I wiedergegeben. Wir sehen in jedem Falle, daß nach dem 4. bis 6. Tag der ersten Vergärung die Wuchsstoffkonzentration zu einem Minimum abfällt, um dann wieder anzusteigen. Dies dürfte so zu erklären sein, daß die Mikroorganismen die Wuchsstoffe aus der Lösung herausnehmen und speichern. Im weiteren Verlauf der Gärung sterben natürlich wieder viele Zellen ab und die dann einsetzende Autolyse muß wieder zu einer Erhöhung der Wuchsstoffkonzentration im Nährboden führen. Die Größe des Minimums und des Wiederanstieges ist nun in verschiedenen Fällen nicht gleich. Unser Bakt. verbraucht*) seine eigenen Wuchsstoffe sehr stark, denn nach einer praktisch wuchsstoffreien Zeit erfolgt nur geringe Wiederanreicherung. Dagegen werden die Wuchsstoffe für Bäckerhefe kaum durch unser Bakt. verbraucht, aber etwas mehr gespeichert. Umgekehrt nimmt die Bäckerhefe nur wenig von ihren eigenen Wuchsstoffen aus der Lösung, viel mehr dagegen von den Bakteriumwuchsstoffen. Dies muß nicht unbedingt bedeuten, daß überhaupt die Wuchsstoffe für Hefe und Bakterium andere sind, sondern kann auch so erklärt werden, daß die Bedürfnisse an den einzelnen Wuchsstoffen für beide Organismen verschieden, das heißt, daß nur die maßgebenden Wuchsstoffe nicht die gleichen sind.

Ein weiterer Versuch befaßte sich mit der Frage, ob durch mehrfache Vergärung die Wuchsstoffe völlig zu entfernen sind. In Tabelle II sind die Ergebnisse (genau wie in Tabelle I) für 2 mal je 6 Tage mit Bakt. bezw. mit Bäckerhefe vergorenem

*) Es kann sich natürlich auch um eine irreversible Speicherung handeln, indem unter den vorliegenden Bedingungen die Herauslösung der Wuchsstoffe aus den Bakterien sehr erschwert ist.

Gurkensaft aufgestellt. Während die dritte Vergärung mit Bäckerhefe noch sehr gut verläuft, ist das Wachstum von Bakt. in dem 2 mal vergorenen Gurkensaft (besonders dem mit Bäckerhefe vergorenen) stark abgeschwächt. Wie aus der Tabelle I hervorgeht, ist jedoch die Zeit von 6 Tagen nicht sehr günstig, da schon wieder zuviel Wuchsstoffe in die Nährlösung gegangen sind. Es gelingt auch tatsächlich, durch günstigere Gärzeiten bei mehrmaliger Wiederholung sowohl mit Bäckerhefe als auch mit Bakt. zu Säften zu gelangen, auf denen unser Bakterium überhaupt nicht mehr wächst. Hierauf wollen wir jedoch in dieser Arbeit nicht näher eingehen.

Es war nun interessant, hinsichtlich der Natur der Bakteriumwuchsstoffe zu sehen, wie sich das Wachstum unseres Bakt. nach Vergärung des Gurkensaftes mit biosreichen und biosarmen Hefen gestaltet. Wenn eine der Bioskomponenten für das Wachstum unseres Bakteriums maßgebend ist, dann wäre es möglich, daß nur nach Vergärung mit einer biosreichen Hefe, noch Wachstum des Bakt. Acetylcholini eintreten kann. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß (wie schon oben zu Tabelle I ausgeführt) die quantitativen Bedürfnisse unseres Bakt. für Bios andere (z.B. viel geringer) sein können, als für Hefen, sodaß der beschriebene Effekt gar nicht sichtbar werden kann. Unsere Versuche (siehe Tabelle III) wurden nun ganz in der Art des I. Versuches auf Gurkensaft durchgeführt, der 2 mal je 5 Tage mit folgenden Hefen vergoren war:

1.) Bierhefe (Löwenbräustamm RS) Reinzüchtung*)
2.) Heferasse M biosarm
3.) „ Lft biosarm
4.) „ U biosreich
} vom Institut für Gärungsgewerbe Berlin.

In jedem Fall ist der Gurkensaft nach der doppelten Vergärung ein nur noch mäßiger Nährboden für das Bakt. Acetylcholini geworden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Heferassen sind jedoch nur gering, sodaß eindeutige Aussagen nicht gemacht werden können. Die Tabelle enthält ferner der Vollständigkeit halber noch entsprechende Kombinationen der Hefe untereinander. Auf eine Darlegung der nicht leicht zu deutenden Effekten muß jedoch verzichtet werden. Das Wachstum unseres Bakt. wurde auch nach nur einmaliger Vergärung mit den Heferassen des Instituts für Gärungsgewerbe bestimmt. Wie aus Tabelle IV hervorgeht, sind die Verhältnisse nicht viel anders wie bei der doppelten Vergärung. (Tabelle III)

*) siehe Fußnote **) Seite 1

Tabelle I.

1. Verg.		2. Vergärung mit Bäckerhefe								2. Vergärung mit Bakterium (10 S)							
mit	Zeit (Tage)		Wachst. n. Tagen	+ 0,1 g Glukose	Wachst. n. Tagen	+ NaOH	Wachst. n. Tagen	NaOH + Glukose	Wachst. n. Tagen		Wachst. n. Tagen	+ 0,1 g Glukose	Wachst. n. Tagen	+ NaOH	Wachst. n. Tagen	NaOH + Glukose	Wachst. n. Tagen
Bäckerhefe	1	+ + +	5	+ + +	5	+ + +	5	+ + +	5	+++	4	+++	4	+ + +	4	+ + +	4
	2	+ +	5	+ + +	5	+ +	5	+ + +	5	+ +	5	+++	5	+ +	5	+ + +	5
	3	+	4	+ + (+)	4	+ +	4	+ + (+)	4	+ −	4	++(+)	4	+ −	4	+ + (+)	4
	4	+ +	3	+ + +	3	+ +	3	+ + +	3	+	3	+	3	(+)	3	+	3
	5	+	3	+ + (+)	3	+	3	+ + (+)	3	(+)	3	+ (+)	3	(+)	3	+	3
	6	+ + (+)	5	++++	5	+ + (+)	5	++++	5	+ (+)	5	+ +	5	+ (+)	5	+ +	5
	7	+ + (+)	5	++++	5	+ + (+)	5	++++	5	+ (+)	4	+ +	4	+ +	4	+ +	4
Bact. acetylcholini (10 S)	1	+ +	4	+ +	4	+ +	4	+ +	4	+++	4	+++	4	+ + +	4	+ + +	4
	2	+ +	5	+ + +	5	+ +	5	+ + +	5	+ +	5	+++	5	+ +	5	+ + +	5
	3	+ +	4	+ + (+)	4	+ +	4	+ + (+)	4	+ −	4	+ +	4	+ −	4	+	4
	4	+ +	3	+ + +	3	+ +	3	+ + +	3	−	4	−	4	−?	4	−?	4
	5	+ +	3	+ + (+)	3	+ +	3	+ + (+)	3	−	3	−	3	−	3	−?	3
	6	++++	5	++++	5	++++	5	++++	5	−	5	−	5	+	5	+	5
	7	+ + +	4	++++	4	+ + +	4	++++	4	+	4	+ (+)	4	+ (+)	4	+ (+)	4

Tabelle II.

Säfte: \ Zusätze:	Beimpft mit Bäckerhefe				Beimpft mit Bakterium-Acetylcholini (10S)			
		+ 0,1 g Glukose	+ NaOH	NaOH + Glukose		+ 0,1 g Glukose	+ NaOH	NaOH + Glukose
Gurkensaft vergoren mit Bäckerhefe	+	+++	+(+)	+++	+−	(+)	+−	(+)
Gurkensaft vergoren mit Bakterium (10S)	++	+++	+++	+++	−	−	+	+

Tabelle III.

Beimpft mit: \ Zusätze	Gurkensaft 2× vergoren mit Hefe „Lft."				Gurkensaft 2× vergoren mit Hefe „U"				Gurkensaft 2× vergoren mit Hefe „M"				Gurkensaft 2× vergoren mit Hefe „Rs"			
		0,1 g Glukose	NaOH	NaOH u. Glukose		0,1 g Glukose	NaOH	NaOH u. Glukose		0,1 g Glukose	NaOH	NaOH u. Glukose		0,1 g Glukose	NaOH	NaOH u. Glukose
Hefe „Lft"	+ −	+	+ −	+ (+)	+ −	+ (+)	+ −	+ +	+ −	(+)	+ −	+ +				
Hefe „U"	+ −	+	+ −	+	+ −	+ (+)	+ −	+ +	+ −	+ +	+ −	+ +				
Hefe „M"	(+)	+	+ (+)	+ +	+ −	+ (+)	+ −	+ (+)	−	+	+ −	+ (+)				
Bier-Hefe „Rs"	+ −	+ (+)	+ −	+ +	+ −	+ +	+ −	+ +	+ −	+ +	(+)	+ +	(+)	+	(+)	+ (+)
Bäcker-Hefe	+ −	+ +	+ −	+ + (+)	+ −	+ + (+)	+ +	+ + (+)	(+)	+ + (+)	(+)	+ + (+)	(+)	+ (+)	(+)	+ +
Bakterium Acetyl-cholini (10 S)	−	(+)	−	+	+ −	+	+ −	+	−	+	−	+	−	+ −	−	(+)

Wachstum nach 4 Tagen (Ges. Vol. 4,0 cm³).

Tabelle IV.

Wachstum (nach 4 Tagen) von Bakt. (10 S) in mit versch. Hefen vergorenem Gurkensaft (4,0 cm^3)

Beimpft mit Bakterium (10 S)					Acetylcholinbildung			
Zusätze: / Gurkensaft verg. m. Hefe-Rasse:	I.	II. 0,1 g Glukose	III. NaOH	IV. Glukose u. NaOH	I.	II.	III.	IV.
Hefe „Lft."	+	++	+	++	−	−	−	++
Hefe „M"	+	++	+	++(+)	−	+−	−	++
Hefe „U"	+	+(+)	(+)	++	−	−	−	++

II. Über Wachstum und Acetylcholinbildung des Bakt. Acetylcholini in verschiedenen Extrakten aus Hefen.

Nachdem aus den Versuchen über das Verhalten der Wuchsstoffe in der Nährlösung während der Vergärung hervorgegangen war, daß unser Bakt. anscheinend die Wuchsstoffe viel stärker zerstört als verschiedene Hefen, bei denen sie z. T. gespeichert werden, lag es nahe, das Wachstum unseres Bakt. in Extrakten aus diesen selbst und in solchen aus verschiedenen Hefen miteinander zu vergleichen. Aus dem Bakt. Acetylcholini konnten, wie zu erwarten — bisher keine aktiven Präparate hergestellt werden (jedenfalls solche nicht, die als Zusatz zu einer Glukose — Salzlösung das Wachstum unseres Bakt. ermöglichen). Aus Hefe ließen sich jedoch nach den verschiedensten Verfahren hochaktive Präparate gewinnen, die als Zusatz zu geeigneten synthetischen Nährböden bis zu einer Konzentration von 1 : 32 noch gutes Wachstum zeigen. Die Herstellung von Präparaten aus käuflicher Bäckerhefe, sowie aus Bierhefe der Löwenbräu A.G. München (Stamm RS) ist in folgendem beschrieben:

Herstellung verschiedener Extrakte aus frischer Bäcker- und Bierhefe[2])

Kochsaft: 300 g Hefe werden in 1000 ccm Wasser aufgeschlemmt, dann auf freier Flamme in einem Emailletopf bis zum Sieden erhitzt und unter ständigem Rühren eine Stunde auf dieser Temperatur belassen. Die Aufschlemmung wird nun eine Nacht stehen gelassen und dann bei 3000 U/Min abgeschleudert. Die Flüssigkeit wird filtriert, sterilisiert und wieder eine Nacht stehen gelassen. Die wiederum auftretende Trübung wird nach 24 Stunden abgeschleudert, abfiltriert und schließlich, um nach Sterilisieren eine klare Lösung zu erhalten, noch 2 mal sterilisiert und filtriert.

Plasmolyse: 300 g Hefe werden in 650 ccm Wasser unter Zusatz von 30 g Natriumazetat aufgeschlemmt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wird abgeschleudert, filtriert und sterilisiert. Sterilisieren und Filtrieren (evtl. durch Kieselgur) wird wie oben mehrfach wiederholt, bis eine klare Lösung bestehen bleibt.

Autolyse: 300 g Hefe werden mit 300 ccm Wasser, 30 ccm Toluol und 30 ccm Essigester durch kräftiges Schütteln in Aufschlemmung gebracht und 4 Tage in einen Brutschrank von 36 - 38°C gestellt. Die weitere Behandlung erfolgt wie oben.

Herstellung verarmter Hefe[3]) und Extrakte daraus.

40 g Hefe werden mit 700 ccm Phosphat-Gemisch unter Zusatz von etwas Toluol aufgeschlemmt und während 12 - 14 Stunden bei einer Temperatur von ca 28°C kräftig mechanisch geschüttelt, unter ständiger Durchleitung von Sauerstoff. Nach Abschleudern wird der feste Rückstand genau wie oben auf Kochsaft und Autolyse verarbeitet.

Trockenhefe aus frischer Löwenbräuhefe und Extrakte daraus.

Die frische Hefe wird auf große Bogen Filtrierpapier in ganz dünner Schicht ausgestreut und in einem warmen Raum unter gelegentlichem Durcheinanderbewegen getrocknet. Die Herstellung von Kochsaft und Autolysat geschieht in gleicher Weise wie bei frischer Hefe.

Bei Mazerationssaft wird die Hefe unter Zusatz der vierfachen Menge Wasser angesetzt und ca 4 Stunden bei ca 38°C belassen. Nach Abschleudern und Filtrieren wird die Flüssigkeit sterilisiert und wie immer zur Erreichung eines klaren Saftes filtriert und sterilisiert.

Preßsaft aus frischer Löwenbräuhefe.

Frische Hefe wird mit einem großen Überschuß Seesand gründlichst verrieben und in der Buchnerpresse mit über 100 Atü abgepreßt. Die Ausbeuten sind sehr mäßig.

Die Ergebnisse mit diesen Hefepräparaten sind in den Tabellen V und VI aufgestellt. Es zeigt sich, daß die verschiedenen Präparate ganz verschiedene Mengen der Wuchsstoffe enthalten. Plasmolysesaft ist am schlechtesten, die Autolyse am besten. Durch Verarmung und Trocknung dürften ebenfalls Verluste an Wuchsstoffen auftreten. Interessant ist auch, daß die Bildung von Acetylcholin in den verschiedenen Säften eine ganz verschiedene ist und durchaus nicht mit dem Wachstum parallel geht. Bei den Bäckerhefepräparaten ist nur bei den Autolysaten und auch dann nur bei Zusatz von Glukose und Ammoniumzetat Acetylcholin nachzuweisen. Bei denjenigen aus Löwenbräuhefe ist die Bildung des Acetylcholin dagegen bedeutend stärker. Die Effekte können nur so erklärt werden, daß die Konzentration der Muttersubstanzen des Acetylcholins in den einzelnen Präparaten sehr verschieden ist.

III. Über die Muttersubstanzen des Acetylcholins.

Als Muttersubstanzen des Acetylcholins können in erster Linie Cholin und Azetat angenommen werden, die dann durch die Einwirkung der Cholinesterase[4]) der Bakterien zu Acetylcholin verestert wurden. Bisher hatten jedoch Keil und B. Kritter[1]) vergeblich versucht, Cholin aus frischem Gurkensaft zu isolieren. Sie nehmen deshalb an: Acetylcholin sei ein Stoffwechselprodukt des Bakt. Acetylcholini, womit also gesagt sein soll, daß Acetylcholin nicht in der Nährlösung, sondern in den Bakterien selbst, aus körpereigenen Substanzen derselben gebildet würde und dann in die Nährlösung abgegeben werden müßte.

Nach dem Auffinden von Nährlösungen, wie best. Hefepräparaten, ferner eines Wickensaftes (vergl. Abschn. V), in denen also acetylcholin — positive Stämme (z. B. 10 S), üppig gedeihen, ohne Acetylcholin zu bilden, war die Wahrscheinlichkeit eigentlich sehr gering, daß Acetylcholin ein Stoffwechselprodukt unseres Bakteriums in oben genanntem Sinne sein könnte. Mit diesen Nährlösungen konnten wir aber ferner prüfen, ob denselben zugesetztes Cholin (bezw. Azetat oder beide Substanzen) überhaupt in Acetylcholin übergeführt werden. Wir untersuchten deshalb bei den nicht acetylcholinbildenden Säften verschiedene Zusätze allein und in Kombination (s. Tab. VII). Bei Autolysat

Tabelle V.

Wachstum des Bact. acetylcholini 10 S in Hefepräparaten.

Hefe-Säfte	Ohne Zusatz: Wachstum bis Verdünnung	Tage	Azetylcholin-Bildung bis Verdünnung	Mit Glukose (5%) NH_4 azetat*): Wachstum bis Verdünnung	Tage	Azetylcholin-Bildung bis Verdünnung
Käufliche Bäcker-Hefe Kochsaft	gut bis 1:4	5	—	stark bis 1:4	5	
	schwach „ 1:8	5		gut „ 1:8	5	—
				schwach „ 1:16	5	
Plasmolyse-Saft	schwach „ 1:1	5	—	gut „ 1:1	5	—
				schwach „ 1:8	5	
Autolyse-Saft	stark „ 1:1	5		stark „ 1:8	6	
	gut „ 1:8	5	—	gut „ 1:16	6	1 : 4
	schwach „ 1:16	5		schwach „ 1:32	6	
Kochsaft aus verarmter Bäcker-Hefe	stark „ 1:1	6		stark „ 1:8	6	
	gut „ 1:8	6	—	gut „ 1:16	6	—
	schwach „ 1:16	6		schwach „ 1:32	6	
Autolyse der verarmten Bäcker-Hefe				stark „ 1:4	4	
	gut „ 1:1	4	—	gut „ 1:8	4	1 : 8
	schwach „ 1:8	4		schwach „ 1:32	4	
Löwenbräu Bier-Hefe Kochsaft				stark bis 1:4	5	
	gut bis 1:1	6	—	gut „ 1:16	5	1 : 8
	schwach „ 1:8	6		schwach „ 1:32	5	
Plasmolyse-Saft	gut „ 1:1	6	1:2 (schwach)	stark „ 1:4	6	
	schwach „ 1:4	6		gut „ 1:8	6	1 : 8
				schwach „ 1:16	6	
Autolyse-Saft	stark „ 1:1	6		stark „ 1:8	5	
	gut „ 1:8	6	—	gut „ 1:32	5	1 : 64
	schwach „ 1:32	6		schwach „ 1:64	5	
Kochsaft aus verarmter Bier-Hefe				stark „ 1:4	6	
	schwach „ 1:1	5	—	gut „ 1:16	6	1 : 32
				schwach „ 1:64	6	
Autolyse der verarmten Bier-Hefe				stark „ 1:4	4	
	gut „ 1:1	4	1:1 (schwach)	gut „ 1:8	4	1 : 32
	schwach „ 1:8	4		schwach „ 1:32	4	

*) Die Konzentrationen der Salze sind wie bei Mai [13]) angegeben, die Konzentration von Glukose ist jeweils angeführt. Die ammonazetathaltige Lösung wurde hergestellt, indem 4 cm^3 einer gesättigten Ammonazetatlösung zu 100 cm^3 Salzlösung gegeben wurden.

Tabelle VI

Wachstum des Bakterium (10 S) in weiteren Hefepräparaten.

Ohne Zusatz				Mit Glukose (20%) Salzlösung (1 : 4)*)		
Säfte von Trockenhefe (Löwenbräu München)	Wachstum bis Verdünnung	Tage	Azetylcholin-Bildung bis Verdünnung	Wachstum bis Verdünnung	Tage	Azetylcholin-Bildung bis Verdünnung
Kochsaft (unsteril. 1 : 3,5)	stark bis 1:4 gut „ 1:16 schwach „ 1:64	4 4 4	1:1 (schwach)	stark bis 1:8 gut „ 1:16 schwach „ 1:32	4 4 4	1 : 4
Mazerationssaft (unsteril. 1 : 4,0)	stark „ 1:2 gut „ 1:16 schwach „ 1:128	4 4 4	1:1 (schwach)	stark „ 1:8 gut „ 1:16 schwach „ 1:64	4 4 4	1 : 4
Autolysat (unsteril. 1 : 3,5)	stark „ 1:16 gut „ 1:64 schwach „ 1:128	4 4 4	1 : 2	stark „ 1:8 gut „ 1:32 schwach „ 1:256	4 4 4	1 : 8
Kochsaft (sterilisiert)	gut bis 1:2 schwach „ 1:8	5 5	1:1 (schwach)	stark bis 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	5 5 5	1 : 8
Mazerationssaft (sterilisiert)	gut „ 1:0 schwach „ 1:4	5 5	—	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	5 5 5	1 : 2
Autolysat (sterilisiert)	stark „ 1.4 gut „ 1:4 schwach „ 1:32	4 4 4	1:1	stark „ 1:8 gut „ 1:64 schwach „ 1:128	5 5 5	1 : 32
+ 0,5 ccm Salzlösung*)				**+ 0,5 ccm Glukose NH_4-Azet.-Salzlösung***)		
Frisch-Hefe-Preß-Saft (sterilisiert)	stark bis 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	4 4 4		stark bis 1:2 gut „ 1:32 schwach „ 1:64	4 4 4	

*) Siehe Fußnote Tabelle V, Gesamtvolumen 2.0 cm^3.

Tabelle VII

Wachstum und Acetylcholinbildung des Bakt. (10 S) nach 4 Tagen unter Zusatz der Muttersubstanzen des Acetylcholins.

Säfte: \ Zusätze:	Cholinchlorid 2%	Glukose 20%-Salzlösung	Glukose NH_4 Acet Salzlösung 20%	Ammonium Acetat 4%	Wachstum bis Verdünnung	Acetylcholin bis Verdünnung
Trocken-Hefe (München) Autolysat. 1 cm^3 (Ges.Vol.2,0cm^3)	—	—	—	—	stark bis 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	—
	0,2 cm^3	0,5 cm^3	—	—	stark „ 1:4 gut „ 1:32 schwach „ 1:64	gut bis 1:16 n. vorh. „ 1:1024
	0,2 cm^3	—	0,5 cm^3	—	stark „ 1:4 gut „ 1:32 schwach „ 1:256	gut „ 1:1024
	—	—	0,5 cm^3	—	stark „ 1:8 gut „ 1:32 schwach „ 1:64	n. vorh. „ 1:8
Kochsaft, verarmter Bäckerhefe 2,0cm^3 (Ges.Vol.4,0cm^3)	—	—	—	—	stark bis 1:1 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	—
	0,4 cm^3	1,0 cm^3	—	—	gut „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:8
	0,4 cm^3	—	1,0 cm^3	—	gut „ 1:16	gut „ 1:2 n. vorh. „ 1:16
Bier-Hefe (München) Kochsaft 2,0cm^3 (Ges.Vol.4,0cm_3)	—	—	—	—	gut bis 1:1 schwach „ 1:8	—
	—	2,0 cm^3	—	—	gut „ 1:4 schwach „ 1:8	—
	—	—	2,0 cm^3	—	stark „ 1:4 gut „ 1:16 schwach „ 1:32	gut bis 1:4
Wickensaft 2,0 cm^3 (Ges.Vol.4,0cm^3)	—	—	—	—	rasch zunehm.	—
	0,4 cm^3	—	—	—	langsam „	+
	0,4 cm^3	—	—	1,0 cm^3	gut	+ +
	0,4 cm^3	—	1,0 cm^3	—	rasch zunehm.	+ +
	0,4 cm^3	1,0 cm^3	—	—	gut	+ +
	—	1,0 cm^3	—	—	gut	—
	—	—	1,0 cm^3	—	rasch zunehm.	+ —
	—	—	—	1,0 cm^3	gut	—

Dieselbe Versuchsreihe (Wickensaft) mit Zus. v. Cholinchlorid, jedoch unbeimpft, ergibt kein Wachstum und kein Acetylcholin.

Tabelle VIIa

Prüfung auf Cholinesterase und Lecithasewirkung des Bakt. (10 S) (Ges. Vol. 4,0 cm^3)

cm^3 verarmter Bäckerhefe-Kochsaft	cm^3 Glukose 20 % — Salzlösung 1 : 4	cm^3 Glukose 20 % — Salzlösung 1:4 + NH_4— Azetat	cm^3 Cholinchlorid 2 %	cm^3 Lecithin 5 %	Wachstum nach 3 Tagen	Acetylcholinbildung nach 4 Tagen
2,0	1,0	—	—	—	++	—
2,0	1,0	—	0,1	—	++	+— ?
2,0	1,0	—	0,2	—	+ (+)	+—
2,0	1,0	—	0,4	—	+ (+)	+ (+)
2,0	1,0	—	0,8	—	+ (+)	++
2,0	—	1,0	—	—	++	—
2,0	—	1,0	0,1	—	++	+—
2,0	—	1,0	0,2	—	++	(+)
2,0	—	1,0	0,4	—	++	+
2,0	—	1,0	0,8	—	++	++
2,0	1,0	—	—	0,2	Zunehmendes Wachstum; (leichte Gasentwicklung)	—
2,0	1,0	—	—	0,4		—
2,0	1,0	—	—	0,8		—
2,0	—	1,0	—	0,2	starke Trübung; Wachstum?	—
2,0	—	1,0	—	0,4		—
2,0	—	1,0	—	0,8		—
—	—	—	0,1	—	—	—
—	—	—	0,2	—	—	—
—	—	—	0,4	—	—	—
—	—	—	0,8	—	—	+— ?

Tabelle VIII

Vergärung von Kohlehydraten

Gurken-Saft, je 4,0 cm³, 6 Tage vergoren mit verschiedenen Hefe-Rassen, und dann beimpt mit Bakterium (10 S) bei Zusätzen von verschiedenen Kohlehydraten.

Zusätze von:	g	Wachstum der Bakterien nach 4 Tagen	
		vergoren mit Hefe „U“	vergoren mit Hefe „M“
Kontrolle	—	+	+
Stärke	0,1		+ + (+)
Inulin	0,1		+ +
Glykogen	0,1		+ +
Dextrin	0,1		+ + (+)
Pektin	0,05		+ + +
Rohrzucker	0,1		+ + (+)
Milchzucker	0,1		+ + (+)
Maltose	0,1		+ + (+)
Glukose	0,1	+ + (+)	+ + (+)
Laevulose	0,1		+ +
Galaktose	0,1		+ + (+)
Glukosamin	0,1		+
Ca-Glukonat	0,1		+ (+)
d- Zuckers. Na	0,1	+	+ +
Mannit	0,1	+ + (+)	+ +
Sorbit	0,1	+ + (+)	+ +
Dulcit	0,1	+ +	+ (+)
Xylose	0,1	+	+ (+)
Arabinose	0,1	+	+ +
Erythrit	0,1		+
Glyzerin	0,12 cm³		+ +

aus Trockenbierhefe, das ohne Zusatz keine nachweisbaren Mengen Acetylcholin bildet, tritt schon durch Zugabe einer Glukose — Salzlösung, die Ammoniumazetat enthält, mäßige, durch Cholinchlorid und Glukose stärkere und durch Cholinchlorid + ammonazetathaltige Glukose — Salzlösung sehr starke Acetylcholinbildung ein. Beim Kochsaft aus verarmter Bäckerhefe ist Zugabe von Azetat dagegen ohne Bedeutung. Bei Kochsaft aus frischer Bierhefe wird schon allein durch Zugabe von Ammonazetat und Glukose viel Acetylcholin gebildet (während nur Glukose keinen Effekt ausübt). In Wickensaft endlich führt Azetat nur zu einer schwachen, alle Kombinationen mit Cholin jedoch zu einer starken Acetylcholinbildung. Nach diesen Versuchen, vor allem auch auf Grund der Wirkung des Azetats, ist es nicht unwahrscheinlich, daß Cholin nicht nur eine mögliche, sondern auch in Gurkensaft die natürliche Muttersubstanz des Acetylcholins ist. Wenn Keil und B. Kritter[1]) Cholin nur aus Weißkrautsaft nicht aber aus Gurkensaft isolieren konnten, so muß dabei an die großen Schwierigkeiten erinnert werden, die einer Erfassung kleiner Cholinmengen in vielen Materialien häufig entgegenstehen. Natürlich könnte das Cholin auch erst aus höheren Verbindungen abgebaut werden, jedoch ist das Bakt. Acetylcholini nicht in der Lage. aus Lecithin Acetylcholin zu bilden. (s. Tabelle VII a) Während das Vorkommen der Cholinesterase[4]) im Bakt. Acetylcholini also recht sicher ist, muß die Anwesenheit von Lezithasen und ähnlichen Fermenten[5]), die unter den vorliegenden Verhältnissen Cholin abspalten, ausgeschlossen werden. Da während der Silierung, z. B. von Gurken möglicherweise andere Bakterien, die solche Fermentsysteme besitzen, aufkommen, kann deshalb noch immer sekundär in Silagen an eine Entstehung von Acetylcholin aus höheren Verbindungen gedacht werden. Jedenfalls läßt sich nach Keil und Kunz[6]) aus Salzgurken im Gegensatz zu frischen Gurken, neben Acetylcholin auch Cholin isolieren, was die genannten Autoren allerdings ausschließlich auf eine Zersetzung des Acetylcholins während der Aufarbeitung zurückführen möchten.

IV. Über die Vergärung verschiedener Kohlehydrate und Salze organischer Säuren durch das Bakterium Acetylcholini.

Über die Substrate, die vom Bakt. Acetylcholini vergoren werden können, liegen bisher nur einige Angaben von Behr[7]) vor. Nach diesem Autor werden außer Glukose noch Mannit (von allen Stämmen) und Raffinose (von $^1/_3$ derselben) vergoren. Der ideale Nährboden für solche Versuche wäre jedenfalls ein synthetischer, der die organischen Salze, Wuchsstoffe und evtl. nötige organische Stickstoffverbindungen in reiner Form enthält.

Da uns diese Substanzen jedoch vorläufig noch unbekannt sind, müssen andere Wege beschritten werden. Eine chemische Methode zur Befreiung natürlicher Nährböden von Kohlehydraten ohne Einfluß auf andere nötige Stoffe ist uns bisher nicht bekannt geworden. Es bleibt also noch übrig, auf biologische Weise die Kohlehydrate zu entfernen, oder an und für sich kohlehydratarme Nährböden zu suchen.

Da bei der Vergärung mit Hefen nur wenig Wuchsstoffe zerstört werden, so ist dieser vielfach in der Bakteriologie beschrittene Weg auch in unserem Falle gangbar. Daß er mit vielen Fehlern behaftet ist, und daß die Ergebnisse nur beschränkte Bedeutung besitzen, ist ohne weiteres ersichtlich. Nach den ersten Tabellen dieser Arbeit schien für unsere Zwecke besonders, die einmalige Vergärung von Gurkensaft mit den Heferassen U, M und Lft in Frage zu kommen. Die Unterschiede im Wachstum, die unser Bakt. nach Tabelle IV auf solchen Säften mit und ohne Zusatz von Glukose zeigt, sind zwar nicht sehr groß, aber immerhin deutlich genug. Es lassen sich deshalb mit dieser Methode nur solche Stoffe einwandfrei charakterisieren, die für unser Bakt. gute Substrate darstellen.

In der Tabelle VIII sind nun eine große Anzahl von Kohlehydraten (Polysacharide, Disaccharide, Hexosen, Pentosen, Triosen, Zuckerderivate) auf diese Weise untersucht.

Nach der Stärke des Wachstums lassen sich die Substanzen in folgender Reihenfolge anordnen:

a) Pektin, Stärke, Dextrin
b) Glukose, Rohrzucker, Milchzucker, Malzzucker
c) Galaktose, Laevulose, Inulin, Glykogen, d-Zuckers. Na, Glycerin, Mannit, Sorbit.

Eine zweifelhafte oder negative Wirkung zeigen:

a) Ca-Glukonat, Xylose, Dulcit, Arabinose
b) Glukosamin, Erythrit.

Es wurde ferner untersucht, ob vielleicht irgendwelche der biologisch wichtigen Karbonsäuren vergoren werden können. Dies ist nach Tabelle IX nicht der Fall; es tritt vielmehr sogar eine schwache Hemmung des Restwachstums in dem mit Hefe vergorenen Gurkensaft auf. Es wurde deshalb noch geprüft, ob irgend eine der untersuchten Substanzen auch in reinem Gurkensaft in den angewandten Konzentrationen eine hemmende Wirkung ausübt. Eine solche Wirkung läßt sich jedoch nicht nachweisen. Es soll schließlich nicht unerwähnt bleiben, daß in einer gleichzeitigen Dissertation von Eyrisch[8]) für Essig- und Buttersäure (sowie für Ameisensäure) quantitativ chemisch nachgewiesen wurde, daß eine Vergärung durch das Bakt. Acetylcholini in Gurkensaft nicht stattfindet.

Tabelle IX

Vergärung von Säuren

Gurken-Saft, 6 Tage vergoren mit verschiedenen Hefe-Rassen, je 4,0 cm^3, beimpft mit Bakterium (10 S) bei Zusatz von verschiedenen Säuren.

Zusätze von: Säuren, (neutral.)	molar	Wachstum der Bakterien (10 S) nach 4 Tagen	
		vorvergoren mit Hefe „U"	vorvergoren mit Hefe „Lft"
Kontrolle		+	+
Essigsäure	0,6	(+)	(+)
Propionsäure	0,4	+—	(+)
Buttersäure	0,4	+—	+—
Iso-Buttersäure	0,4	+—	(+)
Milchsäure	0,4	+	(+)
Brenztraubensäure	0,4	+	(+)
Citronensäure	0,2	(+)	(+)
Aconitsäure	0,2	nicht	+—
Bernsteinsäure	0,4	un-	(+)
Äpfelsäure	0,4	ter-	(+)
Weinsäure	0,2	sucht	+—
Dioxymaleinsäure	0,4		+—

Tabelle XI

Vergärung versch. Kohlehydrate in Hefeautolysat (RS 1:4, 2.0 cm³) mit Bakt. (10 S)

	1. Tag	2. Tag	4. Tag	5. Tag	Acetylcholin-Bildung 5. Tag
+ 0,05 gr. Stärke	+	+(+)	++	++	−
„ Inulin	+	+	+(+)	+(+)	−
„ Glykogen	+	+	+	+(+)	−
„ Dextrin	+	++	++	++	−
„ Pektin	−	+++	+++	+++	++
„ Rohrzucker	+	++(+)	+++	++(+)	++
„ Milchzucker	+−	++(+)	+++	++	+(+)
„ Maltose	+	++(+)	+++	+++	++
„ Glukose	+	++(+)	+++	+++	++
„ Laevulose	+	++	++	++(+)	+(+)
„ Galaktose	+(+)	++(+)	+++	+++	+(+)
„ Mannit	+	++	++(+)	++(+)	+−
„ Sorbit	+	+(+)	++	++(+)	+−
„ Dulcit	+	+	+	+(+)	−
„ Xylose	+−	+	+	+	−
„ Arabinose	+−	++	++(+)	++	+
„ Erythrit	+	+(−)	+(+)	+(−)	−
„ (Kontrolle)	+	+	+	+	−

Tabelle XII Wachstum und Acetylcholinbildung des bact. (10 S) in verschieden. sterilen Pflanzensäften ohne Zusatz.

Säfte	Wachstum bis Verdünnung	Azetylcholin-Bildung bis Verdünnung	Wirkung des Glukosenzuatzes (2.5%) auf:	
			Wachstum	Acetylcholinbildung
Kartoffelsaft	stark bis 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	gut bis 1:1	(+)	(+)
Wickensaft	stark „ 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:1	0	0
Weißklee	stark „ 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:2	0	0
Blauklee	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	schwach „ 1:1	(+)	0
Hederich	stark „ 1:4 gut „ 1:8	schwach „ 1:1	0	0
Rübenblättersaft	stark „ 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:1 n. vorh.*) „ 1:2	(+)	0
Wiesengras	stark „ 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	gut „ 1:1	0	0
Ziergras	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:1	0	0
Markstammkohl	stark „ 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	n. vorh. „ 1:1	0	0
Mangold	gut „ 1:4 schwach „ 1:8	nicht vorhanden	0	0
Apfelsaft (neutralis.)	schwach „ 1:2	nicht vorhanden	0	0
Birnensaft (neutralis.)	schwach „ 1:1	nicht vorhanden	0	0
Dickrüben	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	gut bis 1:1 n. vorh. „ 1:4	0	0
Zuckerrüben	stark „ 1:4 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	gut „ 1:1 n. vorh. „ 1:2	0	0
Weißrüben	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:2	(+)	0
Weißkohl	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:2 n. vorh. „ 1:4	(+)	0

*) n. vorh. = noch vorhanden, (+) = schwache Verstärkung, 0 = kein Einfluß.

Tabelle XIII

Wachstum und Azetylcholinbildung des Bakterium (10 S) in verschiedenen sterilen Pflanzensäften.

Säfte	mit Zusatz von Bierhefe-Autolysat		mit Bierhefe-Autolysat + Glukose 2.5%	
	Wachstum bis Verdünnung	Azetylcholin-Bildung bis Verdünnung	Wachstum bis Verdünnung	Azetylcholin-bildung bis Verdünnung
Bier-Hefe-Autolysat allein	gut	nicht vorhanden	sehr stark	gut
Kartoffel	stark bis 1:16	gut bis 1:2 n. vorh. „ 1:8	s. stark bis 1:16	gut bis 1:4 n. vorh. „ 1:32
Wicken	stark „ 1:16	n. vorh. „ 1:1	s. stark „ 1:16	gut „ 1:16
Weißklee	stark „ 1:16	gut „ 1:1 n. vorh. „ 1:4	stark „ 1:16	gut „ 1:8 n. vorh. „ 1:32
Blauklee	stark „ 1:16	n. vorh. „ 1:2	s. stark „ 1:16	gut „ 1:2 n. vorh. „ 1:16
Hederich	stark „ 1:16	n. vorh. „ 1:2	stark „ 1:16	gut „ 1:16
Rübenblätter	stark „ 1:16	gut „ 1:16	stark „ 1:16	gut „ 1:8 n. vorh. „ 1:32
Wiesengras	stark „ 1:16	n. vorh. „ 1:8	stark „ 1:16	gut „ 1:16
Ziergras	stark „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:16	stark „ 1:16	gut „ 1:8 n. vorh. „ 1:32
Markstammkohl	stark „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:32	stark „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:16
Mangold	stark „ 1:4 gut „ 1:16 schwach „ 1:32	gut „ 1:2 n. vorh. „ 1:8	stark „ 1:16	gut „ 1:8 n. vorh. „ 1:32
Apfel	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	gut bis 1:2 n. vorh. „ 1:8	stark „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:32
Birnen	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:2 n. vorh. „ 1:8	stark „ 1:16	gut „ 1:16
Dickrüben	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:32	gut „ 1:1 n. vorh. „ 1:4	stark „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:32
Zuckerrüben	stark „ 1:2 gut „ 1:8 schwach „ 1:16	gut „ 1:1 n. vorh. „ 1:2	n. untersucht	n. untersucht
Weißrüben	stark „ 1:16	gut „ 1:1 n. vorh. „ 1:8	s. stark bis 1:16	gut bis 1:2 n. vorh. „ 1:16
Weißkohl	stark „ 1:16	gut „ 1:4 n. vorh. „ 1:16	s. stark „ 1:16	gut „ 1:8 n. vorh. „ 1:32

Eine bessere und einfachere Methode, die Vergärbarkeit von Substanzen zu prüfen, fanden wir nun in der Anwendung von verdünntem Hefeautolysat, in dem unser Bakterium ohne Zusatz nur mäßig, mit Zusatz von Glukose aber sehr üppig wächst. Die Ergebnisse (siehe Tabelle XI) sind mit geringen Abweichungen dieselben wie nach der zuerst beschriebenen Methode. Die Stärke des Wachstums nimmt in folgender Reihenfolge ab:

a) Pektin, Glukose, Maltose, Galatose
b) Rohrzucker, Milchzucker, Laevulose, Mannit, Sorbit
c) Stärke, Dextrin, Arabinose
d) Inulin, Glykogen, Dulcit.

Keinen Einfluß hat Xylose, hemmend auf das Restwachstum wirkt Erythrit. Eine deutliche Acetylcholinbildung tritt nur auf bei:

Pektin, Glukose, Maltose, Galatose
Rohrzucker, Milchzucker, Laevulose und Arabinose,

also mit Ausnahme der wichtigen Arabinose nur bei den am besten vergärbaren Substraten.

V. Über die Menge von Nähr-, Wuchs- und Hemmungsstoffen für das Bakt. Acetylcholini in verschiedenen Pflanzensäften.

Für die Praxis erhebt sich nun die Frage, ob in den verschiedenen Pflanzen Nährstoffe und Wuchsstoffe für das Bakt. Acetylcholini in optimaler oder wenigstens ausreichender Menge vorkommen. Das schon von Keil und Weyrauch[9]) in den meisten Pflanzenpreßsäften beobachtete üppige Wachstum dürfte allerdings darauf schließen lassen. Zur Prüfung dieser Fragen wurden Verdünnungsreihen mit den verschiedenen Pflanzensäften angesetzt, unter Zugabe von Substanzen, die gleichzeitig Kohlmeier[10]) und Eyrisch[8]) zu ihren Versuchen unter unsterilen Verhältnissen untersucht hatten, nämlich:

a) Kein Zusatz
b) + 2,5% Glukose
c) + Bierhefeautolysat im Verhältnis 1+1
d) + Bierhefeautolysat im Verhältnis 1+1 + 2,5% Glukose.

Nach dem Sterilisieren wurde mit dem Stamm 10 S des Bakt. Acetylcholini beimpft. Die Verhältnisse waren im übrigen aerob.

Aus der Tabelle XII geht hervor, daß das Wachstum in allen Säften bis auf Birnen, Äpfel und Mangold, die einen schlechten Nährboden für unser Bakt. darstellen (siehe auch Keil und Weyrauch[9]), gleich gut gedeihen und daß die Stärke des Wachstums mit steigender Verdünnung etwa gleichmäßig abnimmt.

Das Wachstum ist bei der Verdünnung 1 : 8 meist noch als gut zu bezeichnen, ein Zeichen, daß Wuchs- und Nährstoffe in reichlicher Menge vorhanden sind. Die Acetylcholinbildung ist meist nur in konzentrierten Säften zu beobachten (Ausnahme Weißkohl und Dickrüben bis Verdünnung 1 : 4). Es zeigte sich ferner, daß ein Einfluß von Glukose auf Wachstum und Acetylcholinbildung nicht besteht. Bei der Mehrzahl der Säfte, auf denen das Bakterium üppig gedeiht, heißt dies also wiederum, daß die Konzentration an Zucker zum mindesten ausreichend ist. Bei Mangold, Äpfel und Birnen, auf denen das Bakterium nicht nur mäßig bis schlecht wächst, sondern auch kein Acetylcholin bildet, kann man das nicht ohne weiteres schließen, aber andererseits ist sicher, daß gerade die Früchte genügende Mengen vergärbaren Zucker enthalten, wenn auch nur wenig Glukose. Bei diesen Säften muß also entweder ein Mangel an Wuchsstoffen oder die Anwesenheit von Hemmungsstoffen vorliegen.

Die Versuche mit Bierhefeautolysat, die überraschenderweise diese Frage der Lösung näher brachten, sind in Tabelle XIII wiedergegeben. In jedem Falle wird eine mehr oder weniger starke Vermehrung des Wachstums bis zu kleineren Konzentrationen der Säfte gefunden, und Acetylcholin tritt auch nun bei Mangold und den Früchten in den höheren Konzentrationen auf. Fügt man jetzt noch Glukose hinzu, so werden die Bedingungen nur noch für Mangold, Früchte und Rüben (mit Ausnahme von Weißrüben) verbessert. Es bestehen nun überhaupt keine Unterschiede im Wachstum mehr, auch die Acetylcholinbildung schwankt nur noch wenig. Diese Erscheinungen legen den Gedanken nahe, die Betrachtungen umgekehrt auf Bierhefeautolysat zu beziehen. Man erkennt nun, daß ein stärkeres Wachstum als in Bierhefeautolysat + Glukose (ohne irgend welchen Zusatz von Pflanzensäften) überhaupt nicht möglich ist, und daß mit diesen Versuchen eigentlich nur hemmende oder fördernde Wirkungen der Pflanzensäfte auf das Wachstum in Hefeautolysat erfaßt werden können. Die meisten Säfte üben demnach auf das kohlehydratarme Hefeautolysat dieselbe Wirkung aus, wie Glukose, und es dürfte kein Zweifel bestehen, die Wirkung der Säfte allein auf vergärbare Zucker zurückzuführen. Die anderen Säfte (Mangold, Früchte und Rüben), zeigen jedoch eine deutliche Hemmung des Wachstums in Hefeautolysat, die bei Mangold am schwächsten, bei Zuckerrüben am größten ist. Da das Wachstum mit steigender Konzentration dieser Säfte aber zunimmt, so kann nur folgende Erklärung möglich sein: Die Säfte enthalten eine große Menge eines Hemmungskörpers, der schon in recht kleinen Konzentrationen seine maximale Wirkung zeigen muß. Sie enthalten relativ wenig Wuchsstoffe, die erst bei größerer Konzentration der Säfte die hemmende Wirkung

teilweise überwinden können. Allerdings bleibt ungeklärt, warum gerade Glukose befähigt ist, diese hemmende Wirkung ebenfalls und sogar vollständig aufzuheben. Es müßte sich um eine spezifische Wirkung der Glukose handeln, die den anderen vergärbaren Kohlehydraten nicht zukommt, da die genannten Säfte an letzteren ja reich genug sind.

Die Anwesenheit von Hemmungsstoffen, die für die schlechten Nährböden, Äpfel und Birnen nicht verwunderlich ist, scheint durch die vorliegenden Versuche gesichert. Wenn Keil und Weyrauch[9]) eine solche für recht unwahrscheinlich hielten, so war dies bei dem damals vorliegenden Versuchsmaterial, besonders da ein solch idealer Nährboden, wie Hefeautolysat, noch unbekannt war, durchaus verständlich. Über das Auftreten von Hemmungen sind bereits mehrfach in den vorhergehenden Arbeiten kurze Notizen erschienen, die hier zusammengestellt seien:

Autor	Saft	Hemmung
Kohlmeier[10])	Wiesengras Zuckerrüben	} im Rohpreßsaft
Frey[11])	Spinat Mangoldblätter	nach mehrf. Sterilis. nach einf. Sterilis.
Henneberg[12])	Zuckerrüben	nach Sterilisieren
Diese Arbeit	Äpfel, Birnen, Mangold, Zuckerrüben, Dickrüben	} nach mehrf. Sterilis.

Es scheint also, daß die Hemmungsstoffe schon in den Rohsäften in kleinen Mengen vorhanden sind, daß aber ihre Konzentration erst durch Erhitzen erheblich ansteigt. Auch konnten wir vielfach feststellen, daß bei anderen Pflanzenproben, z. B. bei Zuckerrüben, auch nach sehr häufigem Sterilisieren, nicht die geringste Hemmung zu beobachten war.

Für die Praxis muß aus diesen Versuchen geschlossen werden, daß ein Zusatz von Hefeautolysat (+Glukose) in allen Fällen günstig und bei solchen Säften, auf denen das Bakt. Acetylcholini schlecht wächst, z. B. Äpfel, Birnen und Mangold, sogar nötig sein kann. Versuche von Kohlmeier[10]), der unter unsterilen anaeroben Bedingungen und solchen, die der Praxis erheblich näher stehen, arbeitete, haben dies bereits bewiesen. Auch die Unbeeinflußbarkeit der anaeroben Silierungsvorgänge durch Zucker, steht mit unseren sterilen Versuchen in Einklang. Die ganz andere

Wirkung dieser Zusätze unter [redacted]aeroben unsterilen Bedingungen, die von Eyrisch[8]) studiert wurden, läßt sich mit unseren Versuchen nicht mehr vergleichen. Letztere mußten aber die Grundlage bilden, zum Studium der weitaus komplizierteren Verhältnisse der Praxis.

Zusammenfassung.

1. Das Bakt. Acetylcholini (Keil) ist nicht in der Lage, auf Glukose — und salzhaltigen Nährlösungen unter Zusatz von Ammonazetat oder — Laktat zu gedeihen. Es wurde wahrscheinlich gemacht, daß es zum Leben minimale Mengen sog. Wuchsstoffe benötigt.
2. Während der Vergärung verschwinden diese Stoffe aus der Nährlösung, in dem sie zum größeren Teil verbraucht (oder irreversibel gespeichert), zu einem kleineren Teil reversibel gespeichert werden. Der letztere Anteil geht bei der Autolyse der abgestorbenen Bakt. wieder in die Nährlösung über, sodaß ältere Gäransätze wuchsstoffreicher sind als jüngere. Ähnliche Versuche werden an verschiedenen Hefestämmen durchgeführt.
3. Die Darstellung von Präparaten, die das Wachstum des Bakt. Acetylcholini nach Zugabe zu glukose — und salzhaltigen Nährlösungen ermöglichen, gelang nicht aus dem Bakt. selbst, wohl aber und auf recht verschiedenen Wegen aus Hefe. Die stärkste Wirkung zeigte ein Autolysat aus Löwenbräuhefe.
4. An solchen Hefepräparaten, sowie an Wickensaft konnte ferner gezeigt werden, daß Cholin und Acetat die Muttersubstanzen des Acetylcholins sind. Das Bakt. Acetylcholini besitzt demnach eine Cholinesterase. Die Anwesenheit einer cholinabspaltenden Lezithase konnte nicht festgestellt werden.
5. In Versuchen mit kohlehydratarmen Nährböden, die einmal durch Vergärung von Gurkensaft mit verschiedenen Hefen, zum anderen durch Autolyse von Hefe erhalten wurden, konnte gezeigt werden, daß das Bakt. Acetylcholini befähigt ist, eine große Anzahl von einfachen und polymeren Hexosen, sowie Arabinose und verschiedene Zuckerderivate, nicht aber Salze der verschiedensten Karbonsäuren zu vergären.
6. Unter sterilen aeroben Bedingungen wurden Verdünnungsreihen verschiedener Pflanzensäfte nach Zusatz von Glukose, Bierhefeautolysat und beiden Präparaten zusammen, auf das Wachstum des Bakt. Acetylcholini untersucht. Dabei zeigte sich,
   a) daß bei den meisten Futterpflanzen Nähr- und Wuchsstoffe für das Bakt. Acetylcholini in reichlichen Mengen vorhanden sind.

b) daß sich die Anwesenheit von Hemmungsstoffen für das Wachstum des Bakt. Acetylcholini nur in folgenden sterilisierten Pflanzensäften, nämlich Birnen, Äpfel, Mangold, Zuckerrüben und Dickrüben nachweisen läßt.

7. Aus diesen Versuchen werden Schlüsse für die Brauchbarkeit der genannten Zusätze zu Silagen gezogen, die in einer gleichzeitigen Arbeit von Kohlmeier auch bereits ihre Bestätigung erhielten.

Literatur.

1. W. Keil und B. Kritter: Biochem. Z. 276 (1935) 61.

1a. F. Kögl und B. Tönnies: Über das Biosproblem, Darstellung von kristallisiertem Biotin aus Eigelb, Z. Physiol. Chem. 242 (1936) 43.

1b. S. Orla-Jensen, N. C. Otte, A. Snog-Kjaer: The Vitamin and nitrogen requirements of the lactic acid bacteria: Kgl. Danske Vidensk. Selsk., Naturv. o. Math. Afd. 9, Vi, 5.

1c. R. J. Williams und D. H. Saunders: Über die Wirkungen von Jnosit, Vitamin B I und Pantothensäure auf das Wachstum verschiedener Hefestämme. Biochem. Journ. 28 (1934) 1887

1d. F. Kögl und A. J. Haagen — Smit: Biotin und Aneurin als Phytohormone. Z. Physiol. Chem. 243 (1936) 209.

2. F. Kögl und W. van Hasselt: Z. Physiol. Chem. 242 (1936) 74.

3. H. Wieland und O. Klaren: Liebig's Ann. Chem. 492 (1932) 185.

4. R. Ammon: Ergebnisse der Enzymf. IV, (1935) 102

5. S. Belfanti, A. Contardi und A. Ercoli: Ergebn. der Enzymf. V, (1936) 213

6. W. Keil und E. Kunz: Arch. f. exp. Path. u. Pharmak. 177 (1934) 25.

7. A. Behr: Dissertation Heidelberg 1936.

8. K. Eyrisch: Dissertation Heidelberg 1937.

9. W. Keil und L. Weyrauch: Z. Bakt. II, 1937 im Druck.

10. E. Kohlmeier: Dissertation Heidelberg 1937.

11. E. Frey: Dissertation Heidelberg 1937.

12. K. Henneberg: Handb. d. Gär. Bakt. II. Aufl. 1926.

13. J. Mai: Dissertation Heidelberg 1937.

Zum Schlusse meiner Arbeit möchte ich es nicht versäumen,

Herrn Professor Dr. Fr. Eichholtz

für die Überlassung des Themas,

sowie

Herrn Dr. Möller

für seine freundl. Ratschläge, meinen besten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Ich, Gotthard Decker, wurde am 20. März 1913 als Sohn des Dentisten Gotthard Decker und dessen Ehefrau in Heidelberg geboren.

Nach 4 Jahren Volksschule besuchte ich das Realgymnasium meiner Vaterstadt und legte im März 1933 die Reifeprüfung ab. Darauf studierte ich an der Heidelberger Universität Zahnheilkunde. Im Sommer 1934 machte ich das Physikum. In der Zeit von April bis September 1935 genügte ich meiner Arbeitsdienstpflicht und bestand im Frühjahr 1937 das zahnärztliche Staatsexamen.

Gotthard Decker.